компетентных клеток в крови морских свинок не позволяет оценить степени эффективности каждого иммуномодулирующего средства в отдельности.

SUMMARY

In this article it is submitted the estimation immunomodulating properties of known preparations on its ability to restore lost immunological reactivity. It is established that the most effective preparation in this respect is roncoleukinum (an index of protection of 79%). Also it is shown that definition of the most active in the immune answer immunocompetent cells in blood of guinea-pigs does not allow estimating a degree of efficiency of everyone immunomodulating means separately.

Литература

1. С.И. Гельберг, Е.А. Финкель. К методике экспериментального изучения иммуногенных свойств противотуберкулезных вакцин и эффективность методов их применения. Пробл. туберкулеза. 1959, № 2. С. 80–84.
2. А.А. Евглевский. Способ подавления повышенной чувствительности животных при введении туберкулина или малеина. Патент SU № 1825630, кл. А 61К 39/35, 1993.
3. Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский. Иммунодефициты домашних животных. М.: 1996, 96 с.
4. Л.Н. Фонталин, Л.А. Певницкий. Иммунологическая толерантность. М.: Медицина, 1978. С. 165–176.

УДК 576.8:616-002.5

З.Г. Воробьева, М.А. Кульчицкая, К.Н. Слинина, А.Л. Лазовская
ГНУ Научно-исследовательский ветеринарный институт

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИКОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К МИКОБАКТЕРИЯМ ТУБЕРКУЛЕЗА

Широко известна эффективность применения различных пробиотиков для профилактики и коррекции дисбиозов у людей и животных, вызванных многими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. В процессе жизнедеятельности бактерии-пробионты вырабатывают комплекс биологически активных соединений, избирательно воздействующих на болезнетворные бактерии. Например, лизоцим резко снижает способность грамотрицательных бактерий к делению и размножению, молочная кислота замедляет их рост, перекись водорода разрушает их клеточную стенку. Бактериоцины обладают бактериостатистическим действием на грамотрицательную и грамположительную флору. По силе воздействия на негативную кишечную микрофлору, а также на микрофлору влагалища препараты из живых бактерий могут быть альтернативой антибиотикам. Дополнительным механизмом, усиливающим защитные свойства пробиотиков является обмен сигнальными молекулами с иммунокомпетентными клетками слизистых оболочек, стимулирующий продукцию секреторного иммуноглобулина А, комплемента, лизоцима и блокирующий прикрепление патогенных бактерий к поверхности слизистой [1, 3, 4].

В ветеринарии назрела необходимость применения пробиотиков с антагонистическими свойствами против микобактерий туберкулеза в связи с тем, что молодняк скота обычно заражается туберкулезом алиментарным путем в первые дни жизни.

В литературе хорошо освещены различные методы изучения антагонистического действия пробиотиков на различные бактриальные патогены. Чаще всего культуры засевают на чашки Петри с питательным агаром перпендикулярными штрихами или перекрещивающимися каплями. Существенно отличаются и критерии оценки полученных результатов, но чаще всего о степени антагонистической активности бактерий судят по величине зоны задержки роста индикаторных микробов. Значительно реже оценивается количество индикаторных бактерий (КОЕ) , на которое представители пробиотиков оказывают ингибирующее действие. Поэтому данные, получаемые различными авторами при изучении микробного антагонизма не всегда однозначны [2].

Трудность изучения антагонизма пробиотиков и патогенных микобактерий заключается в особенностях биологии этих видов: очень медленный рост и особые требования к средам затрудняют их одновременное выращивание.

Целью данного исследования явилась

разработка различных способов изучения антагонистической активности пробиотика «Окарин» по отношению к микобактериям различных видов.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы микроорганизмов, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва): M. tuberculosis (шт. Академия), M. bovis (шт. Vallee, Ravenal, BCG), M. avium (шт. ГИСК), M. phlei (1). Пробиотик «Окарин» выпускает фирма ИмБио (г. Нижний Новгород) филиал фирмы «Микроген» (г. Москва) в лиофилизированной форме. В состав пробиотика «Окарин» входят три штамма Escherichia coli (Г-35-1/59, Г-35-2/60, Г-35-3/61) и один штамм Enterococcus faecalis (Г – 35- 4/62).

Лиофилизированный пробиотик для работы разводят в изотоническом растворе хлорида натрия так, чтобы в 1мл содержалось 5±2 х 10^7КОЕ.

Микобактерии культивировали на плотных яичных средах Левенштейна-Иенсена и Финн-2. Инкубирование пробиотика, микобактерий и смеси пробиотика с микобактериями проводили на среде Сотона. Разведение культур микобактерий в изотоническом растворе хлорида натрия проводили так, чтобы в контроле при посеве 10мкл суспензии микроорганизмов на плотную среду вырастало от 20 до 40 колоний. Эти разведения отрабтывали для каждого штамма отдельно.

Фильтраты культуральных жидкостей готовили с помощью стерилизующих фильтров type GSO 0,22мкм для шприцов с предварителным центрифугированием при 4000 об/мин. Гретые фильтраты и гретую суспензию пробиотика «Окарин» получали прогреванием пробирок с культуральными жидкостями на водяной бане при 100є С в течение 5-10 минут.

Опыты по изучению бактерицидной активности фильтратов проводили следующим образом:

1 серия – засевали суспензию микобактерий в объеме 10мкл, содержащую взвесь с концентрацией приблизительно 500 млрд. клеток в 1 мл с последующим фильтрованием через 6 суток выращивания;

2 серия - засевали суспензию пробиотика в объеме 10 мкл, содержащую 5-10х10^7 КОЕ в 1мл с последующим фильтрованием через 6 суток выращивания (серия 2а – негретый фильтрат, серия 2б – гретый фильтрат);

3 серия – засевали суспензию пробиотика в объеме 10 мкл, содержащую 5-10х10^7 КОЕ в 1мл и через 6 суток выращивания при 37° С прогревали при 100° С на водяной бане в течение 5-10 минут;

4 серия – засевали суспензию пробиотиков и микобактерий (отдельно для 4 видов : а, б, в, г) в тех же объемах соответственно с последующим фильтрованием через 6 суток выращивания.

Измеряли рН культуральных фильтратов. Наслаивали фильтраты и гретую суспензию пробиотика на плотные питательные яичные среды в количестве 1мл и выдерживали в термостате при 37° С до полного всасывания в среду. После всасывания фильтратов и суспензии проводили посевы микобактерий пяти видов на 3 пробирки с плотной средой и культивировали до 40 дней при 37° С.

Во всех опытах проводили контрольные посевы для сравнительного подсчета колоний на средах с культуральными фильтратами и без них. Опыты считали правильно поставленными, если количество микроорганизмов в контрольных посевах колебалось от 20 до 40 колоний и было легко считаемым. После подсчета колоний в контроле и в опыте вычисляли индекс блокирования роста (ИБР): ИБР = K_1/ K_2, где K_1 - количество колоний в контроле,_ K_2 - количество колоний в опыте.

Все опыты проводили в трехкратной повторности._

Результаты и обсуждение

Посевы микобактерий в среду Сотона не выявили их роста в течение 10 суток инкубации. Посевы пробиотика «Окарин» на среду Сотона дали через 2 суток достаточно хороший рост, сопоставимый по плотности с посевом на мясо-пептонный бульон.

Измерение рН фильтратов показало незначительные колебания от 6,9 до 7,2, что не могло отразиться на росте микобактерий. В опытах по изучению воздействия культуральных фильтратов (четырех серий) на рост микобактерий (табл.) были получены следующие результаты: культуральные фильтраты серии 1 не оказывали действия на скорость роста и количество колоний микобактерий при выращивании их на двух питательных средах.

Фильтраты серии 2 (гретые и негретые) снижали число колоний микобактерий в 2,4-3,6 раза. Гретая суспензия пробиотика «Окарин» (серия 3) оказывала такое же действие на микобактерии как и его фильтраты, снижая число колоний микобактерий в 2,4 раза . Фильтраты серии 4 (совместное инкубирование пробиотика и микобактерий четырех видов) существен-

но влияли на количество выросших колоний микобактерий, снижая их число в 6-9 раз.

Отмечено также бактериостатическое действие фильтратов (серия 4): появление колоний в присутствии таких препаратов отставало на 2-10 дней по сравнению с контролем. Исследование влияния срока хранения культуральных фильтратов при 4° С выявило их активность в течение 1 года хранения (срок наблюдения).

Таким образом, в результате проведения опытов разработаны два способа изучения антагонистической активности пробиотика «Окарин» по отношению к четырем видам микобактерий. Наиболее перспективным оказался способ, основанный на совместном инкубировании пробиотика и микобактерий с последующим получением стерильного фильтрата и изучения его действия на рост колоний микобактерий. Повидимому совместное инкубирование пробиотика «Окарин» и микобактерий стимулирует выработку пробиотиком бактериоцинов, угнетающе влияющих на рост культур микобактерий.

Особый интерес представляют собой фильтраты, полученные при совместном инкубировании пробиотика и M. phlei. Это сапрофитный вид микобактерий, достаточно далекий по таксономии от туберкулезных микобактерий, однако фильтрат, полученный после совместного инкубирования с пробиотиком так же активен, как и фильтраты, полученные после инкубирования пробиотика с туберкулезными микобктериями.

Выводы

1. Разработаны способы изучения антагонистического воздействия пробиотика «Окарин» на патогенные микобактерии с использованием стерильных культуральных фильтратов, полученных в результате выращивания пробиотика и пробиотика с микобактериями разных видов.

2. Фильтраты, полученные после выращивания пробиотика «Окарин» на среде Сотона (гретые и негретые) оказывают умеренное влияние на рост микобактерий, снижая КОЕ в 2-3 раза.

3. Пробиотик «Окарин» в жидкой синтетической среде Сотона в присутствии микобактерий вырабатывает бактерицидные вещества, оказывающие бактериостатическое и бактерицидное действие на рост патогенных микобактерий и снижающее КОЕ микобактерий при выращивании на плотных питательных средах в 6-9 раз.

Индекс блокирования роста (ИБР) препарата «Окарин» по отношению к штаммам патогенных микобактерий

№ серии опытов	Варианты опыта	Штаммы					Среднее значение ИБР
		M. avium (ГИСК)	M. tuberc (Академия)	M. bovis (Vallee)	M. bovis (Ravenal)	M. bovis (BCG)	
1	Фильтрат суспензии микобактерий	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2а	Фильтрат пробиотика негретый	3,2	2,0	1,3	4,6	1,0	2,42
2б	Фильтрат пробиотика гретый	5,0	1,0	4,0	1,48	6,0	3,67
3	Суспензия пробиотика гретая	1,4	2,6	1,0	1,0	6,0	2,4
4а	Фильтрат пробиотика с M. Bovis (BCG)	15,8	5,5	5,1	5,5	7,1	7,8
4б	Фильтрат пробиотика с M. tuberc (Acad.)	10,0	3,1	5,1	6,5	5,36	6,07
4в	Фильтрат пробиотика с M. avium (ГИСК)	8,5	5,2	1,7	12,75	10,0	7,62
4г	Фильтрат робиотика с M. phlei (№ 1)	14,0	5,3	9,6	-	-	9,6

- исследование не проводили

РЕЗЮМЕ

Разработаны способы изучения антагонистической активности пробиотика «Окарин» на патогенные микобактерии с использованием стерильных культуральных фильтратов, полученных в результате выращивания пробиотика или пробиотика с микобактериями в жидкой среде Сотона. В присутствии микобактерий пробиотик вырабатывает активные бактериоцины, снижающие КОЕ микобактерий при выращивании на плотных средах в 6-9 раз.

SUMMARY

New methods to evaluate the antagonistic activity of the probiotic preparation "Okarin" in respect to pathogenic mycobacteria using sterile filtrates after growing of probiotic strains or simultaneous growing of probiotic strains and mycobacteria on Sauton –medium are developed. In presence of mycobateria the probiotic strains produce some bacteriocins which reduce the colony forming units while growing of mycobacteria on solid media by 6-9 times.

Литература

1. Н.В. Данилевская. Фармакологические аспекты применения пробиотиков // Ветеринария, 2005, № 11. С. 6-10.
2. Е.И. Ермоленко, В.А. Исаков, С.Х. Ждан-Пушкина, В.В. Гец. Количественная оценка антагонистической активности лактобацилл // Микробиология, 2004, № 5. С. 94-98.
3. А.Н. Панин, Н.И. Малик. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных // Ветеринария, 2006, № 7. С. 3-6.
4. М.В. Тюрин, Б.А. Шендеров, Н.Г. Рахимова. К механизму антагонистической активности лактобацилл // Микробиология, 1989, № 2. С. 3-8.

В.И. Дедяев, И.В. Жуков

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА ПЕПСОВИТ ПРИ ДИАРЕЙНОМ СИНДРОМЕ ПОРОСЯТ, ВЛИЯНИЕ ПЕПСОВИТА НА ИММУННЫЙ СТАТУС

В 2005 году ветеринарными лабораториями Липецкой области на колибактериоз происследовано 2573 проб, из них положительных 550 или 21,4%. На колибактериоз рогатого скота приходится от общего числа положительных – 33,1%, свиней – 13,1%, птицы – 50,4%. Заболевание свиней сальмонеллезом регистрировалось в 11%, дизентерией – в 19%, отечной болезнью – 24%.

От свиней чаще выделяются серотипы эшерихий 08, 0139, 0141, К-88, сальмонелла суис.

На крупных фермах с круглогодовыми опоросами заболевание чаще принимает стационарный характер и не имеет определенной сезонности. Чередование вспышек и спадов связано с ухудшением санитарных условий приема опоросов, скармливанием глубокосупоросным и опоросившимся свиноматкам недоброкачественных кормов, питательной неполноценностью рационов маток и поросят, иммунным состоянием маток. Источником инфекции являются больные и переболевшие поросята, а также взрослые животные – носители возбудителей, которые выделяют во внешнюю среду большое количество антитгена, загрязняя корма и окружающие предметы.

Для борьбы и профилактики заболевания поросят диареей в хозяйствах осуществляется комплекс мероприятий, направленных на повышение общей резистентности организма поросят-сосунов, улучшение ветеринарно-санитарных условий при опоросе маток и уничтожение возбудителя во внешней среде.

Перспективным являются разработки и использование дешевых кормовых добавок из местного сырья.

Для лечения и профилактики колибактериоза нами был испытан препарат энтеросгель, цеолитосодержащая порода (ЦСП) Тербунского месторождения Липецкой области, микрокристаллическая целлюлоза и препарат пепсовит применяемые как детоксицирующие средства в борьбе со многими болезнями животных.

При применении энтеросгеля два раза в сутки по 3 г. сохранность поросят группы 0–4 месяца составила 92–96%, привесы увеличивались на 30–50%, при обычной схеме лечения с применением антибиотиков сохранность была 72–76%.

При применении цеолитсодержащих пород по 50 г в сутки в корм поросят группы 2–4 месяца сохранность была выше на 4,5%, среднесуточный прирост живой массы таких поросят был на 9,5% выше, чем в контрольной группе.

Расширение производства и применения в ветеринарных целях энтеросгеля и цеолитсодержащих пород позволил повысить эффективность лечебно-профилактических мероприятий при заболеваниях поросят с диарейным синдромом.

В неблагополучных хозяйствах проводят вакцинацию супоросных свиноматок против колибактериоза на 82–92 день супоросности, при необходимости вакцинируют поросят старше 10- дневного возраста. Вакцину подбирают с учетом выде-